BULLETIN DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
2e Série — Tome 39 — N° 3, 1967, pp. 588-594.

RÔLE DE L'ISOXANTHOPTÉRINE SUR LE DÉVELOPPEMENT ENDOTROPHE DE L'OURSIN ARBACIA LIXULA [1]

Par Coryse DEZÈRE

Depuis la mise en évidence, dès 1935 (Lwoff et Lederer), de la nécessité de facteurs organiques pour la croissance normale des Flagellés et des Bactéries, l'importance des composés organiques de l'eau de mer n'a fait que s'affirmer en écologie marine. Plantes et animaux secrètent dans le milieu ambiant des substances « ectocrines » qui peuvent influencer d'autres animaux, et Kirschenblatt (1951) a proposé le terme de « télergones » pour désigner de telles substances. Les « télergones » identifiées sont extrêmement variées : acides aminés, antibiotiques, antimétabolites, et vitamines telles que la B_{12}, dont l'action sur la survie d'*Artemia salina* a été étudiée au laboratoire (Hernandorena, 1963).

Dans cette même ligne d'études, Fontaine et Pillafort (1963) ont mis en évidence la présence de ptérines dans la peau dorsale de l'Anguille, puis leur excrétion dans le milieu ambiant — et, secondairement, ce résultat fut étendu à d'autres animaux marins (travaux inédits) —, ce qui conduit à rechercher si les ptérines peuvent être considérées comme des télergones.

En effet les ptérines, substances hétérocycliques découvertes par Hopkins (1889) dans les ailes de papillons, ont été retrouvées un peu partout dans le monde vivant et ont été isolées, par exemple, chez les algues bleues (Forest, 1958), les insectes (ailes de papillons : Busnel et coll., 1951 ; yeux de drosophiles : Viscontini et coll., 1937 ; système endocrine : L'Helias, 1956), chez les vertébrés poïkilothermes (écailles et peau des poissons, peau des amphibiens) et chez les homéothermes.

Le rôle physiologique des ptérines est reconnu : elles peuvent être des facteurs de croissance de certains protozoaires (Nathan, 1958), participer à la mélanogenèse chez les arthropodes et les vertébrés (Polonowsky et coll., 1950) ou, du fait de leur structure qui se retrouve dans l'acide folique, jouer un rôle comme éléments intermédiaires dans le métabolisme de ce corps et intervenir dans de nombreuses synthèses cellulaires (Ziegler-Gunder, 1955).

Nous avons utilisé, comme bioessais de ptérines, la vitesse de segmentation de l'œuf et la rapidité de développement des larves de l'oursin *Arbacia lixula*. En effet, de nombreux travaux ont été effectués sur les larves d'oursin qui, du fait de leur sensibilité, ont été utilisées pour la

1. Recherche effectuée avec l'aide de la D.G.R.S.T.

détermination de certaines qualités d'eaux de mer très diverses. Nous avons soumis ce matériel biologique à l'action d'une ptérine synthétique, l'isoxanthoptérine, qui est particulièrement intéressante du fait que, lors des isolements par chromatographie à partir de substances naturelles, elle est l'une de celles qui apparaissent le plus régulièrement.

A. Matériel et méthodes.

Wilson (1951), puis Wilson et Armstrong (1952) ont montré que des différences entre diverses eaux de mer pouvaient être mises en évidence par la rapidité de développement de larves d'oursins (*Echinus esculentus*). Ce test a été perfectionné et repris par de nombreux auteurs pour étudier les effets biologiques de Cu, Zn (Bougis, 1959, 1961, 1965) ou Ag, Hg Soyer, 1961) ; puis le test de Wilson a été interprété par Bougis (1964) qui distingue la première phase du dévelopement de la larve, ou phase endotrophe, et la deuxième étape, pendant laquelle la larve trouve dans le milieu les matériaux dont elle a besoin, ou phase exotrophe. N'ayant pas à notre disposition le plancton nécessaire pour alimenter les larves, nous nous sommes limités, dans nos expériences, à la phase endotrophe en étudiant la cinétique embryonnaire de la segmentation et le degré de réalisation du squelette des larves au stade pluteus.

1) *Matériel.*

Les oursins *Arbacia lixula* proviennent de la région de Banyuls. Après grattage de la région aborale nettoyée à l'eau douce, la lanterne d'Aristote est ôtée, les intestins sont lavés à l'eau de mer et les oursins, stimulés par le contact de l'eau douce, émettent sur des verres de Borel leurs produits génitaux. Les œufs d'une même femelle sont lavés, tandis que le sperme est dilué dix fois au moins.

Dans de nombreuses expériences, les œufs sont conservés pendant quelques heures dans le milieu à étudier, des essais nous ayant confirmé que, conservés en faible quantité dans des béchers, leur développement ultérieur ne s'en trouvait pas modifié.

Un essai préliminaire nous ayant assuré que 95 % des œufs sont fécondés en eau de mer naturelle, nous pratiquons la fécondation artificielle dans les milieux à étudier, une même quantité d'œufs étant déposée dans des béchers contenant 250 ml.

Chaque milieu est préparé en trois exemplaires ; un bécher est réservé à l'étude de la segmentation. Environ 90 minutes après la fécondation, des œufs sont prélevés toutes les cinq minutes et déposés dans de l'aldéhyde formique à 5 % afin de déterminer le stade des œufs en développement. Nous nous sommes limités à l'étude de la première segmentation, lorsque l'œuf est au stade à deux blastomères, puisque selon Wolfson (1959), le retard provoqué pour la première segmentation est comparable à celui obtenu lors des autres clivages et est représentatif de l'action du produit

étudié. Nous déterminons le temps nécessaire pour que 50 % des œufs atteignent le stade à deux blastomères.

Les deux autres béchers sont utilisés pour faire les prélèvements des pluteus à des heures déterminées. Les pluteus sont filtrés sur du papier millipore, séchés à l'étuve à 37°C et montés avec de l'huile de cèdre. Cent mesures de spicules par lot sont effectuées, de l'extrêmité de la baguette somatique à celle de la baguette postorale.

2) *Préparation des milieux.*

Les expériences sont réalisées avec de l'eau de mer naturelle en provenance de Roscoff, gardée quelques semaines à l'obscurité et filtrée sur verre fritté (porosité 4).

L'isoxanthoptérine est ajoutée à cette eau, aucune méthode artificielle n'étant utilisée pour faciliter sa dissolution. Les ptérines, à la concentration utilisée (2 mg/l), se dissolvent lentement, en un mois environ, et nous avons suivi cette évolution par l'augmentation de la fluorescence. Les milieux ainsi préparés ont été conservés environ deux mois à l'obscurité avant d'être utilisés pour l'expérience.

Nous avons choisi d'étudier l'isoxanthoptérine (K et K Laboratories, New-York) susceptible de se retrouver dans le milieu naturel, soit telle quelle, soit sous forme de produit de décomposition. Toutefois il faut noter que le produit utilisé contient des impuretés révélées par chromatographie faite au laboratoire (MOMZIKOFF).

3) *Traitement des résultats numériques.*

Lors des prélèvements de pluteus, la mesure de cent spicules pour chaque lot permet de construire un histogramme (nombre de spicules ayant une taille donnée). Pour mettre en évidence les différences de longueur des spicules, il nous a paru intéressant de comparer les médianes et non les moyennes. En effet la médiane correspond à la taille au-dessus et en dessous de laquelle il y a 50 % des spicules ; cette valeur centrale présente l'avantage d'être peu sensible aux valeurs extrêmes de la population de mesures et de ne pas préjuger du caractère gaussien de cette distribution, que nous avons cependant constaté assez régulièrement. Ensuite nous appliquons le teste du χ^2 sur ces médianes en comparant pour chaque dose animaux traités et animaux témoins, afin d'éprouver la significativité des différences constatées.

Pour suivre l'action du produit, nous avons construit la courbe indiquant les différences des médianes obtenues pour chaque dose par rapport à la médiane du groupe contrôle ; il nous a été possible ainsi de considérer simultanément les résultats obtenus avec différentes femelles.

Résultats.

1) *Fécondation et cinétique de la fécondation.*

La fécondation des œufs d'*Arbacia lixula* s'effectue de façon normale dans nos milieux contenant de l'isoxanthoptérine, même pour la plus forte dose utilisée (2 mg/l) et même si les œufs et le sperme ont été au préalable conservés pendant quelques heures dans ce même milieu.

La cinétique de la segmentation des œufs n'est pas modifié par l'apport d'isoxanthoptérine dans l'eau de mer naturelle. En effet, le temps nécessaire pour que 50 % des œufs aient atteint le stade à deux blastomères est comparable à celui que l'on observe pour les œufs du groupe contrôle, qui ne sont pas soumis à l'action du produit.

L'addition d'isoxanthoptérine à l'eau de mer ne perturbe donc ni la fécondation ni la segmentation des œufs d'oursin.

2) *Croissance des pluteus pendant la phase endotrophe.*

Pour chaque dose d'isoxanthoptérine, les expériences ont été répétées deux ou trois fois ; nous avons construit nos courbes à partir de la moyenne de ces données.

Les doses allant de 1 à 2 mg/l, qui n'empêchent ni la fécondation ni la segmentation des œufs, arrêtent le développement pour la plupart d'entre eux au stade coeloblastule. Les quelques pluteus formés présentent des bras de longueur inférieure aux témoins, et cette différence s'accentue de 44 à 67 heures après la fécondation. La dose de 500 γ/l d'isoxanthroptérine n'empêche pas le développement normal des œufs jusqu'au stade pluteus ; l'allongement des spicules est inférieur à celui du lot témoin lors des prélèvements effectués à 44 et 52 heures, mais ce retard n'est pas acquis de façon définitive. Il en est de même pour les doses variant de 200 à 500 γ/l, l'inhibition de la croissance des spicules étant, lors du prélèvement à 44 heures, proportionnelle à la dose. 200 γ/l constitue une dose-seuil pour laquelle on n'observe plus d'action sur le dévelopement des larves.

Les différences de longueur des spicules entre le milieu témoin et le milieu contenant des doses supérieures à 200 γ/l proviennent de la longueur de la baguette postorale, car les longueurs des baguettes somatiques sont comparables.

Il nous a paru intéressant de rechercher l'action de doses très faibles susceptibles d'exister dans l'eau de mer naturelle, de l'ordre de 1 à 10 γ/l. Lorsque les œufs déposés dans un tel milieu sont fécondés dans la demi-heure suivante, la croissance des pluteus est normale. Par contre, si les œufs vierges sont laissés pendant au moins deux heures en contact avec le produit l'allongement des spicules des pluteus est inférieur à celui de témoins issus d'œufs conservés pendant le même temps dans l'eau de mer pure, à la même température, avant la fécondation.

En conclusion, des doses faibles d'isoxanthoptérine laissées en contact quelques heures avec les œufs vierges ralentissent l'allongement des spicules des pluteus. Par contre l'addition de 20 à 200 γ/l du même produit à l'eau de mer naturelle n'apporte pas de modification dans l'allongement des spicules de pluteus pendant la phase endotrophe du développement. Cependant des doses supérieures entraînent une inhibition de plus en plus marquée du développement des baguettes postorales du pluteus, puis empêchent la gastrulation. Nous observons donc une courbe d'inhibition de croissance en forme de U renversé, dont le sommet correspond à une inactivité du produit (fig. 1).

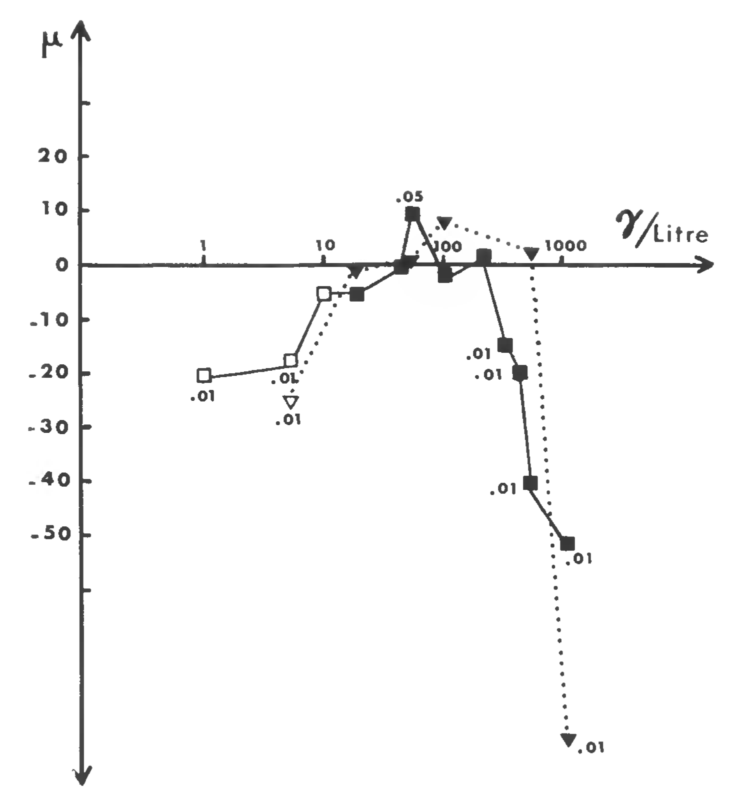


Fig. 1. — Différences des longueurs médianes des pluteus de chacun des lots soumis à diverses doses d'isoxanthoptérine, par rapport au lot témoin.

Notas : Les significations éventuelles de ces différences, correspondant à p = 0,05 ou 0,01, sont indiquées sur le graphique. — La courbe en trait plein est relative aux prélèvements à 44 heures, celle en tireté aux prélèvements à 67 heures. — Pour les doses de 1 à 10γ/l (Carrés et triangle blancs) les résultats figurés ici ont été obtenus en laissant pendant au moins deux heures les œufs vierges en contact avec l'isoxanthoptérine.

Les processus physiologiques qui sont modifiés lors du développement d'*Arbacia* par l'isoxanthoptérine ne peuvent encore être précisés. Il semble toutefois que l'action inhibitrice sur la croissance des spicules

puisse être acquise et ne se révéler que lors de la différenciation. En effet, les œufs vierges gardés trois heures dans un milieu contenant 1 à 10 γ/l d'isoxanthoptérine se segmentent normalement après la fécondation mais la croissance du squelette est ralentie ; cette inhibition est acquise dans l'œuf vierge, puisque des œufs n'ayant pas subi le même traitement préalable se développent comme les témoins.

La perméabilité de la membrane de l'œuf à l'isoxanthoptérine n'est pas en cause, puisque des doses supérieures laissées en contact quelques heures avec les œufs n'entraînent pas une inhibition de la croissance.

Il sera intéressant de reprendre ces expériences avec d'autres produits, et en particulier de préciser la période de sensibilité des embryons d'oursins vis-à-vis des ptérines. Cependant, nous pouvons dès maintenant concevoir que ces substances puissent avoir une action biologique sur les êtres marins à leurs concentrations naturelles ; elles pourraient alors, de ce fait, être considérées comme des télergones.

Résumé.

Une action de l'isoxanthoptérine à des doses diverses a été mise en évidence sur le développement endotrophe de l'œuf d'oursin Arbacia lixula. On observe des inhibitions de la croissance des bras des pluteus en particulier pour des concentrations qui semblent susceptibles d'exister dans l'eau de mer naturelle.

Laboratoire de Physiologie des Etres marins
de l'Institut Océanographique, Paris.

BIBLIOGRAPHIE

Bougis, P., 1959. — Sur l'effet biologique du cuivre en eau de mer. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **249**, pp. 326-328.

— 1959. — Sur l'effet biologique du zinc en eau de mer. *Ibid.*, **253**, n° 4, pp. 740-741.

— 1964. — Sur le développement des pluteus *in vitro* et l'interprétation du test de Wilson. *Ibid.*, **259**, n° 5, pp. 1250-1251.

— 1965. — Effet du cuivre sur la croissance du pluteus d'oursin (Paracentrotus lividus). *Ibid.*, **260**, n° 10, pp. 2929-2931.

Busnel, U. G., 1950. — Nouvelles acquisitions sur les ptérines des insectes. *8th Int. Congr. Ent.*

Fontaine, M., S. Pillafort, et A. M. Sapse, 1963. — Présence de ptérines dans la peau dorsale d'*Anguilla anguilla* L. et leur excrétion dans le milieu ambiant. Contrôle du métabolisme des ptérines par l'hypophyse. *C. R. Soc. Biol.*, **157**, n° 10, pp. 1721-1724.

— — 1963. — Recherche inédite.

Forest, H. S., C. Van Baalen & J. Myers, 1958. — Isolation and identification of a new pteridine from a blue-green alga. *Arch. Biochem. Biophys.*, **78**, pp. 95-99.

HERNANDORENA, A., 1963. — Mise en évidence de l'action de la vitamine B12 sur la suivie d'*Artemia salina*. *Bull. Mus. Hist. nat.*, **35**, nº 5, pp. 507-514.

HOPKINS, F. G., 1889. — Note on a yellow pigment in butterflies., *Nature*, **40**, p. 335.

KIRSCHENBLATT, J. D., 1957. — Classification de certaines substances, biologiquement actives, élaborées par les organismes vivants. *Travaux Soc. Natur. Leningrad.*, **73**, nº 4, pp. 225-228.

L'HELIAS, C., 1956. — Isolement de substances pré ou cohormonales du complexe post-cérébral. *Bull. Biol.*, **91**, pp. 241-263.

LWOFF, A. et E. LEDERER, 1935. — Remarques sur l'extrait de terre envisagé comme facteur de croissance pour les Flagellés. *C. R. Soc. Biol.*, **119**, pp. 971-973.

NATHAN, H. A., S. H. HUTNER & H. L. LEVIN, 1958. — Assay of pteridines with Crithidia fasciculata. *J. Protozool.*, **5**, pp. 134-138.

POLONOWSKI, M., R. G. BUSNEL & A. BARIL, 1950. — Rôle d'un pigment ptérinique, le fluorescyanine dans la mélanogénèse. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **231**, pp. 1572-1573.

SOYER, J., 1963. — Contribution à l'étude des effets biologiques du mercure et de l'argent dans l'eau de mer. *Vie et Milieu*, **14**, nº 1, pp. 1-34.

VISCONTINI, M., E. HADORN & P. KARRER, 1957. — Fluoreszierende Stoffe aus Drosophila melanogaster — die roten Augenfarbstoffe S. Mitteilung. *Helv. Chim. Acta.*, **40**, pp. 579-585.

WILSON, D. P., 1951. — A biological difference between natural sea water. *J. mar. Biol. Assoc. U. K.*, **30**, pp. 1-26.

— & F. A. J. ARMSTRONG, 1952. — Biological differences between seawaters. *Ibid.*, **31**, pp. 335-349.

WOLFSON, N., 1959. — Retardation of cleavage in sea urchin eggs by cells extracts. *Exp. Cell Res.*, nº 18, pp. 504-511.

ZIEGLER-GUNDER, I., 1955. — Ptérine : Pigmente und Wiskstoffe im Tierreich. *Biol. Reviews*, **31**, nº 3, pp. 313-348.